

EL PAPER DEL GEN N-*ras* EN LA TUMOROGÈNESI I EL DESENVOLUPAMENT

ÀNGEL PELLICER

Department of Pathology, New York University, School of Medicine. Nova York, EUA.

Text de la conferència inaugural del curs 1994-1995, pronunciada a la Sala Prat de la Riba de l'IEC el dia 10 d'octubre de 1994.

Versió catalana de Ma. Elena Ibáñez de Sans. Departament de Biologia Cel·lular i Fisiologia. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.

INTRODUCCIÓ

El càncer és la subversió dels controls regulatoris que mantenen cada tipus cel·lular dins d'un determinat patró de proliferació i diferenciació que permet un funcionament harmònic de l'organisme. La majoria d'aquests patrons de proliferació són determinats genèticament, i fins i tot aquells que responen a influències externes ho fan modulant l'expressió dels gens que intervenen en el procés corresponent. Per això, per estudiar el càncer des d'un punt de vista molecular, és necessari investigar els canvis estructurals o funcionals en els gens de la cèl·lula tumoral i determinar-ne la funció fisiològica. Això permetrà desenvolupar estratègies racionals per aturar els efectes nocius d'aquests gens.

Un esdeveniment pioner en la recerca del càncer va ser la identificació dels gens individuals implicats en el procés cancerigen, primer en retrovirus animals i posterior-

ment en el genoma de diversos mamífers, inclòs l'humà. Aquests descobriments inicials van sentar les bases per a l'anàlisi de diferents tipus de tumors en busca de les alteracions genètiques específiques que poguessin explicar la transformació maligna en diversos teixits. Els gens que estan involucrats en el desenvolupament de processos tumorals han rebut el nom d'*oncogens* i de *gens supressors de tumors*.

IDENTIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'ONCÒGENS

Els nostres estudis s'han centrat en els limfomes de timus murins induïts per carcinògens químics i radiacions ionitzants, un sistema model que ens proporciona flexibilitat experimental i un nombre suficient d'individus per aconseguir resultats significa-

tius. Els limfomes obtinguts van ser analitzats per transfecció en cèl·lules NIH3T3, i aquells que generaven focus transformats s'utilitzaven per tal d'identificar l'oncogen responsable. Un cop vam descobrir que, en els tumors, els gens *N-ras* i *K-ras* estaven activats (Guerrero *et al.*, 1984c), procedírem a aïllar-los per clonatge molecular (Guerrero *et al.*, 1984a). La seqüenciació dels oncògens activats demostrà que diferien dels seus respectius equivalents normals en un sol parell de bases (Guerrero *et al.*, 1984b; Guerrero *et al.*, 1985). La presència d'aquesta mutació puntual en el gen rep el nom d'*activació* i és la responsable del fenotip anormal induït en la cèl·lula transformada.

El següent pas consistia a analitzar tumors que havien estat induïts per diferents agents carcinògens per tal d'investigar si hi estaven implicats els mateixos gens o bé gens diferents i si hi havia o no una especificitat en els tipus de mutacions segons l'agent utilitzat per a induir els tumors. Vam trobar que, dels tres membres de la família *ras* (*H-*, *K-* i *N-ras*), sols *K-* i *N-ras* estaven activats en aquests tumors, però mai *H-ras* (Diamond *et al.*, 1988; Newcomb *et al.*, 1988). Això ens va portar a analitzar l'expressió dels tres gens *ras* en diferents teixits. Els resultats d'aquesta anàlisi indicaren que els tres gens *ras* s'expressen en tots els teixits analitzats, malgrat que hi ha una gran variabilitat en els nivells d'expressió segons el teixit (Leon *et al.*, 1987). Així, vam trobar que en el timus *K-* i *N-ras* s'expressen a uns nivells elevats mentre que *H-ras* s'expressa a baixos nivells. En canvi a la pell, un teixit on molts dels tumors experimentals analitzats contenen un gen *H-ras* activat, la taxa d'expressió estava invertida. Això sembla indicar que hi ha una relació entre el nivell d'expressió i la probabilitat que el gen s'activi en aquell teixit. La hipòtesi actual per a explicar aquesta correlació proposa que malgrat els tres gens *ras* són dianes equiva-

lents per mutagènesi, independentment del teixit, tant sols són seleccionats per a induir la formació de tumors quan tenen una funció biològica activa. I això només és possible en aquells teixits en els quals el gen és expressat a nivells rellevants.

ACTIVACIÓ MUTACIONAL

A més de l'especificitat per alguns dels gens *ras*, era important analitzar si hi havia una especificitat mutacional per part de l'agent inductor. Per a aquest estudi utilitzarem el carcinogen químic MNU (metil nitròs urea) i dos agents físics, la radiació gamma i els neutrons. L'MNU produeix mutacions principalment en la segona base del codó 12 de *K-ras* (40% dels tumors) i canvia la glicina per l'àcid aspàrtic. Això implica una transició de G:C a A:T (Diamond *et al.*, 1988; Newcomb *et al.*, 1988) que és consistent amb les propietats químiques conegudes de l'MNU. Curiosament, els tumors induïts per radiació gamma (una radiació ionitzant de baixa LET) també presentaven una transició consistent de G:C a A:T en la segona base del codó 12 (Diamond *et al.*, 1988), malgrat que la freqüència total de mutacions en els gens *ras* era inferior (25% dels tumors). Per contra, en els tumors induïts per neutrons (una radiació ionitzant d'alta LET), només el 17% presentaven mutacions en els gens *ras*. Aquestes alteracions no seguien cap patró i no vam trobar cap tumor que presentés la mateixa mutació detectada en els limfomes induïts per MNU o raigs gamma (Sloan *et al.*, 1990). Aquests resultats indiquen que, a més de la possible especificitat química de l'MNU, hi podria haver un factor addicional que facilités l'acumulació o la selecció del dany en la segona posició del codó 12 de *K-ras* en aquells tumors induïts per radiació de baixa LET. Pel que fa als neutrons el resultat és molt diferent i suggereix que el dany provo-

cat per la radiació d'alta LET no pot ser reparat d'una forma homogènia i dona lloc a un patró de mutacions a l'atzar.

EFFECTES EN EL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI

Malgrat que hi ha una associació freqüent entre les mutacions en els gens *ras* i el desenvolupament del tumor, tant en humans com en sistemes model animals, no ha estat formalment demostrat que l'activació dels gens *ras* desencadeni el desenvolupament del tumor. De fet podria succeir que els gens *ras* estiguessin associats amb els tumors únicament per la seva coneguda inestabilitat genètica. Per analitzar aquesta qüestió fou necessari treballar de nou amb sistemes animals ja que el disseny experimental requeria induir un tumor *in vivo* utilitzant un oncogen. En aquest sentit, els ratolins transgènics constituïen un candidat ideal. Els primers experiments van consistir en la introducció de l'oncogen N-*ras* activat, prèviament aïllat d'un limfoma de timus, en la línia germinal del ratolí i controlar si els animals transgènics desenvolupaven el tumor. Cap dels animals nascuts va resultar ser transgènic, cosa que indicava que l'oncogen era letal durant el desenvolupament embrionari.

Per aprofundir en aquesta qüestió vam realitzar dos tipus d'experiments dissenyats per a analitzar diferents estadis durant el desenvolupament. En la primera aproximació, els embrions microinjectats es cultivaven *in vitro* en unes condicions adequades perquè es desenvolupessin fins a la fase de blastocist expandit. En comparar el percentatge d'embrions que assolien aquest estadi entre el grup que havia estat microinjectat amb un fragment irrellevant de DNA i el grup que havia estat microinjectat amb l'oncogen N-*ras* vam trobar que només el 12 %

dels embrions microinjectats amb l'oncogen van assolir l'estadi de blastocist expandit comparat amb un 21 % dels injectats amb el DNA control. Això confirmaria la idea que l'oncogen exerceix algun efecte nociu durant les fases primerenques del desenvolupament embrionari, però el fet que no hi hagi una supressió total suggereix que hi podria haver algun altre efecte exercit en fases més avançades del desenvolupament. Per explorar aquesta hipòtesi els embrions van ser implantats just després de la microinjecció i es van analitzar en diferents moments del desenvolupament. Els temps escollits van ser 7 dies i mig, 8 dies i mig i 10 dies. Els paràmetres analitzats foren la morfologia i la presència del transgen en l'embrió. Els fenotips morfològics detectats van ser: normal, aturada primerenca i aturada tardana. En determinar la presència del transgen per PCR utilitzant seqüències específiques per a la construcció transgènica es va observar que pràcticament a tots els embrions normals mancava el transgen, mentre que aproximadament la meitat dels embrions aturats contenien l'oncogen. El pròxim pas a fer serà analitzar l'expressió de l'oncogen exogen per tal de determinar si hi ha una correlació addicional d'aquest paràmetre amb una morfologia determinada. En qualsevol cas, la conclusió d'aquests experiments és que hi ha un efecte inhibidor del desenvolupament normal per part de l'oncogen N-*ras* i els experiments d'hibridació *in situ*, utilitzant sondes específiques per al transgen, ens proporcionaran informació sobre aquells teixits on l'expressió de l'oncogen té efectes deleteris.

SOBREEXPRESSIÓ DEL PROTOONCOGEN *IN VIVO*

Per tal d'intentar produir ratolins transgènics viables vam haver de posar l'oncogen

sota el control d'un altre promotor. Vam escollir l'MMTVLTR del virus del tumor mamari de ratolí (Mangues *et al.*, 1990). Es prepararen construccions sota el control d'aquest promotor, tant per la versió normal del gen *N-ras* de ratolí com per l'activada, les quals es van microinjectar en embrions de ratolí. Amb l'oncogen *N-ras* activat vam obtenir únicament dos ratolins transgènics, que van morir poc després del naixement amb limfomes i, per tant, no vam poder establir cap línia transgènica. Sorprenentment, però, els ratolins transgènics per la construcció normal van desenvolupar tumors; preferentment carcinomes de glàndula mamària i hiperplàsies de la glàndula de Harder (Mangues *et al.*, 1992). Per tal de determinar el mecanisme de tumorigènesi, es va analitzar l'expressió del transgen en diferents teixits dels animals transgènics i dels seus germans no transgènics. Els resultats indicaren que el transgen s'expressa en aquells teixits on hi ha expressió dels promotors induïts per esteroides: glàndula mamària, glàndula salival, alguns òrgans hemopoètics, glàndula de Harder, etc. En aquestes línies de ratolins el transgen és sobreexpressat respecte al gen endògen, en part és degut al fet que hi ha còpies extres d'aquest gen però també perquè estan sota el control d'un promotor diferent. Els experiments de cinètica indicaren que hi havia un augment en el nivell d'expressió del transgen paral·lel a l'edat del ratolí. Aquest augment en el nivell constant d'expressió està correlacionat amb la desmetilació de diferents regions del promotor MMTV i indica que aquest és el possible mecanisme que explicaria l'augment del missatge amb el temps (Mangues, Schwartz *et al.*, a). En algun moment de la vida de l'animal té lloc un altre esdeveniment que incrementa l'expressió del transgen unes deu vegades més i que desencadena el desenvolupament del tumor. Aquest increment addicional de l'ex-

pressió no està correlacionat amb un augment addicional de desmetilació i, per tant, hi ha d'haver altres factors, com ara mutacions en el promotor o activació dels factors de transcripció, que estimulin el promotor MMTV. Fins ara no hi hem detectat cap mutació. Un altre punt que requeria aclariment era la presència o absència de mutacions activadores de *N-ras* que poguessin ser responsables del desenvolupament del tumor. Amb l'aplicació de la tècnica de RT-PCR sobre DNA de tumor i la posterior seqüenciació del producte no s'ha detectat cap mutació activadora (Mangues *et al.*, 1992), cosa que indicaria que la sobreexpressió del protooncogen normal és suficient per a predisposar les cèl·lules a la transformació maligna.

Aquesta és la primera demostració *in vivo* d'un fenomen que havia estat prèviament descrit en cultiu de teixits, on la sobreexpressió del gen *ras* normal podia desencadenar la transformació de fibroblasts de rosegador. En les línies transgèniques, el 30 % dels animals desenvolupava carcinomes mamaris malgrat que la majoria dels animals presentava hiperplàsia de la glàndula de Harder. Per tal d'investigar la cooperació de la sobreexpressió de *N-ras* amb altres factors, tant en el desenvolupament de carcinomes mamaris com de limfomes de timus, es van tractar amb MNU els animals transgènics i els seus germans no transgènics, seguint un protocol que produeix un alt percentatge de limfomes de timus. Es controlaren les freqüències de formació de tumors i el període de latència en els diferents grups. En els animals transgènics tractats amb MNU, la incidència de carcinomes de glàndula mamària no va variar, però el període de latència va disminuir de dotze a vuit mesos. Ara bé, els limfomes de timus, que són molt poc comuns (menys del 5 %), van augmentar després del tractament fins al mateix nivell que en els no transgènics trac-

tats amb MNU (50 %). Els no transgènics tractats no van desenvolupar cap carcinoma mamari (Mangues, Kahn *et al.*). D'aquests experiments, se'n desprèn que el transgen és un component essencial en la carcinogènesi mamària però no té cap funció significativa en el desenvolupament de limfomes. L'MNU sembla que cooperi amb el gen *N-ras* en el desenvolupament de tumors mamaris provocant, en els primers estadis del procés, la mutació d'altre(s) gen(s) que d'una altra manera podrien ser estocàsticament desregulats posteriorment i que són necessaris per al desenvolupament del tumor.

Com ja s'ha comentat, els experiments descrits proporcionen una important evidència sobre el paper de la sobreexpressió dels protooncògens en el desenvolupament del tumor. Però a més ens indiquen que una minuciosa anàlisi del gen *ras* en certs tipus de tumors, com el de pulmó, possiblement hauria estat poc adequada perquè les mutacions dels gens *ras* són molt poc freqüents en aquests tumors. Això podria haver fet passar per alt el fet que la sobreexpressió del gen normal podria estar relacionada en el procés tumoral.

L'ONCOGEN *N-ras* INDUEIX LIMFOMES DE TIMUS

Malgrat tot el que s'ha dit fins ara, l'objectiu inicial de la nostra recerca, o sigui, demostrar que l'oncogen *N-ras* pot provocar limfomes de timus, no havia estat encara assolit. Per abordar aquesta qüestió era necessari obtenir línies transgèniques viables per a l'oncogen *N-ras*. Es va decidir modificar el promotor per restringir-ne l'expressió i permetre així completar el desenvolupament embrionari. D'aquesta manera podríem controlar els efectes de l'oncogen en estadis més avançats. La modificació va consistir en l'eliminació de la meitat 5' de

l'MMTVLTR. La microinjecció d'aquesta construcció en embrions de ratolí va permetre obtenir diversos animals fundadors a partir dels quals s'establiren línies transgèniques. Els ratolins d'aquestes línies van desenvolupar limfomes de timus amb una freqüència elevada (60-70 %) (Mangues, Schwartz *et al.*, *b*). Així, aquests experiments demostren que l'oncogen *N-ras*, prèviament aïllat d'un limfoma de timus, pot ser el factor determinant en el desencadenament de la formació d'aquest tumor ja que és l'únic gen que ha estat introduït en el sistema. Aquestes observacions segueixen els postulats de Koch per demostrar que un agent infeccios és el responsable d'una malaltia determinada i, per tant, representen un pas clau en la demostració que els oncògens són la pedra angular en el desenvolupament del càncer.

RATOLINS AMB EL GEN *N-ras* INACTIVAT PER KNOCKOUT

Com ja s'ha comentat, per entendre el paper dels oncògens en la carcinogènesi és necessari determinar-ne la funció fisiològica. Seguint els passos de la genètica bacteriana, una correcta aproximació per dissecar la funció d'un gen és obtenir mutants inactivats. En els mamífers, en ser diploids, és necessari actuar sobre els dos alels i això es pot aconseguir mitjançant l'ús de la tècnica del *knockout*. Aquesta aproximació requereix la transfecció d'una construcció del gen d'interès en una cèl·lula mare embrionària o *embryonic stem cell* (ES); d'aquesta manera s'actua sobre el gen endogen per recombinació homòloga. Un cop aïllades les cèl·lules ES que contenen un dels alels inactivat, s'injecten en blastocists que en ser transferits donaran lloc a ratolins mosaic. Si les cèl·lules que deriven de les ES migren a línia germinal, una part dels descendents de l'animal mosaic estaran constituïts totalment per

cèl·lules derivades de les ES i contindran un dels alels pel gen d'interès inactivat en totes les seves cèl·lules. Creuaments subsegüents entre animals heterozigots produiran descendents que seran doble *knockout* i, per tant, mancats totalment d'aquell producte gènic. En col·laboració amb el Dr. R. Kucherlapati de l'Albert Einstein College of Medicine, hem obtingut ratolins amb el gen *N-ras* inactivat per *knockout* (Umanoff *et al.*). El nombre de descendents *knockout* obtinguts és el 25 % esperat del creuament entre dos heterozigots *knockout* i, per tant, la inactivació del gen *N-ras* sembla que no és perjudicial per al desenvolupament embrionari. L'anàlisi molecular d'aquests ratolins revela una absència total de la proteïna *N-ras* p21 en els òrgans analitzats però es detecten altres proteïnes *ras*. Després d'un any, els ratolins amb el gen *N-ras* inactivat segueixen manifestant un fenotip normal, cosa que suggereix que algunes de les funcions del gen *N-ras* podrien ser assumides per altres membres de la família i podria succeir que en realitat no haguéssim fet cap assaig de les funcions específiques de *N-ras*. En qualsevol cas, aquests ratolins seran molt útils per tal de determinar si hi ha una funció particular del gen *N-ras* i per a analitzar quins processos alternatius poden compensar la seva pèrdua. D'aquesta manera tindrem una potent aproximació per confirmar la funció de *N-ras* en els diferents teixits i per dissenyar estratègies per modular-ne l'activitat quan esdevé activat en els tumors.

Els estudis presentats aquí proporcionen una idea de com ha evolucionat l'estudi del càncer en l'última dècada; des dels assaigs biològics fins a identificar i caracteritzar molecularment els gens implicats en el procés utilitzant cultius cel·lulars. Més tard ha estat possible analitzar-ne els efectes *in vivo* i, més recentment, determinar-ne la funció fisiològica mitjançant l'ús de la tècnica de *knockout* i els assaigs bioquímics.

BIBLIOGRAFIA

- DIAMOND, L. E.; I. GUERRERO; A. PELLICER (1988). «Concomitant K- and N-ras gene point mutations in clonal murine lymphoma». *Mol. Cell. Biol.*, núm. 8, pàg. 2233-2236.
- GUERRERO, I.; P. CALZADA; A. MAYER; A. PELLICER (1984). «Molecular approach to leukemogenesis: Mouse lymphomas contain an activated c-ras oncogene». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 81, pàg. 202-205.
- GUERRERO, I.; A. VILLASANTE; V. CORCES; A. PELLICER (1984). «Activation of a K-ras gene by somatic mutation in thymic lymphomas induced by gamma radiation». *Science*, núm. 225, pàg. 1159-1162.
- (1985). «Loss of normal N-ras allele in a mouse thymic lymphoma induced by a chemical carcinogen». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 82, pàg. 7810-1874.
- GUERRERO, I.; A. VILLASANTE; P. D'EUSTACHIO; A. PELLICER (1984). «Isolation, characterization and chromosome assignment of mouse N-ras gene from carcinogen induced thymic lymphoma». *Science*, núm. 225, pàg. 1031-1043.
- LEÓN, J.; I. GUERRERO; A. PELLICER (1987). «Differential expression of the ras gene family in mice». *Mol. Cell. Biol.*, núm. 7, pàg. 1535-1540.
- MANGUES, R.; J. M. KAHN; I. SEIDMAN; A. PELLICER (enviat). «An overexpressed N-ras proto-oncogene cooperates with N-methylnitrosourea in mouse mammary carcinogenesis».
- MANGUES, R.; S. SCHWARTZ; I. SEIDMAN; A. PELLICER (enviat). «Promoter demethylation in MMTV/N-ras transgenic mice is age-dependent, tissue specific, and required for transgene expression and tumorigenesis».
- (en preparació, b). «Modification of the MMTV promoter driving the N-ras transgene induces a high incidence of thymic lymphomas».
- MANGUES, R.; I. SEIDMAN; J. W. GORDON; A. PELLICER (1992). «Overexpression of the N-ras proto-oncogene, not somatic mutational activation, associated with malignant tumors in transgenic mice». *Oncogene*, núm. 7, pàg. 2073-2076.
- MANGUES, R.; I. SEIDMAN; A. PELLICER; J. W. GORDON (1990). «Tumorigenesis and male sterility in transgenic mice expressing a MMTV/N-ras oncogene». *Oncogene*, núm. 5, pàg. 1491-1497.
- NEWCOMB, E. W.; J. J. STEINBERG; A. PELLICER (1988). «Ras oncogenes and phenotypic staging in N-methylnitrosourea- and gamma-irradiation-induced thymic lymphomas in C57BL/6J mice». *Cancer Res.*, núm. 48, pàg. 5514-5521.
- SLOAN, S. R.; E. W. NEWCOMB; A. PELLICER (1990). «Neutron radiation can activate K-ras via point mutation in codon 146 and induces a different spectrum of ras mutations than does gamma